

令和元年6月19日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10887

研究課題名(和文) 滲出型加齢黄斑変性におけるHTRA1遺伝子に起因する血管新生メカニズムの解析

研究課題名(英文) Function analysis for HTRA1 in AMD neovascularization.

研究代表者

家島 大輔(Daisuke, Iejima)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：10617137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：滲出型加齢黄斑変性(Wet-AMD)は、網膜の黄斑に生じる新生血管により中心視野が障害される難治性網膜疾患であるが、その発症メカニズムはまだまだ不明な点が多いことから、本研究は、Wet-AMDにおける血管新生メカニズムを明らかにすることを目的としている。先行研究より、HTRA1を全身性に強制発現させたマウスにおいて、網膜新生血管が観察されたことから、HTRA1の発現亢進が網膜における血管新生を促進することが予想されているが、このHTRA1と網膜における血管新生の関係は分かっていない。そこで本研究は、HTRA1の発現上昇を起点とした網膜における血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性の発症原因となる遺伝的要因として、遺伝学的な解析からHTRA1の関与が示唆されているが、どのようにしてHTRA1が加齢黄斑変性の発症に寄与しているかは分かっておらず、生物学的な発症メカニズムは不明なままである。

本研究は、HTRA1とTGF betaの関係に着目し、発症メカニズムの一端を明らかにするものである。本研究の成果により、HTRA1の機能に関する分子メカニズムおよびAMDの発症メカニズムの一端が明らかになり、将来的には、加齢黄斑変性の予防ならびに治療に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wet-type age-related macular degeneration (Wet-AMD) is an intractable disease in the field of ophthalmology in which the central visual field is impaired by the new blood vessels generated in the macula of the retina, but the mechanism of onset is still unclear. This study aims to clarify the angiogenic mechanism in Wet-AMD. According to the previous study, in mice in which HTRA1 was forced to be expressed systemically, retinal neovascularization similar to Wet-AMD was observed in the retina, and thus enhanced expression of HTRA1 in vivo promotes angiogenesis in the retina. As expected. However, the causal relationship between this upregulation of HTRA1 and angiogenesis in the retina is unknown. In this study, we focused on the relationship between HTRA1 and angiogenesis, and conducted experiments to clarify the mechanism of angiogenesis in the retina starting from the elevated expression of HTRA1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：HTRA1 AMD TGF beta VEGF

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は、欧米や日本をはじめとした主要先進国において成人の失明や視力低下の主要原因となっている網膜疾患で、その病態から、萎縮型 (dry-AMD) と滲出型 (wet-AMD) に大別され、欧米人では dry-AMD が、日本人では wet-AMD が患者の多くを占める。AMD は人種的な要因や、光などの環境的要因、喫煙や食生活などの習慣的要因、さらにはいくつかの感受性遺伝子が影響する遺伝的要因が相互に作用することで生じる多因子疾患であると考えられており、特に遺伝的要因に関してはこれまでに複数の感受性遺伝子が報告されている (Klaver CC., et al. Arch. Ophthalmol. 1998., Klein BE., et al. Am. J. Epidemiol. 2001., Hammond CJ., et al. Ophthalmology 2002.)

特に、日本人の AMD 患者の体部分を占める wet-AMD については、10 番染色体上の 10q26 領域にある ARMS2-HTRA1 の変異が wet-AMD の発症と強く相関することが知られており (DeWan, A. et al. Science, 2006)、我々が実施した日本人の wet-AMD 患者を対象とした全ゲノム相関解析においても、ARMS2-HTRA1 の遺伝子領域の遺伝子多型が強く相関することが認められた (Goto, Akahori et al, JOBDI 2010)。これまでの先行研究と、我々のグループが行った解析により、wet-AMD においては、染色体 10 番の ARMS2-HTRA1 領域に強い相関が観察されており、この領域のタグ SNP である rs10490924 (ARMS2 A69S) が強く相関することが示されているが、rs10490924 と連鎖不平衡を共有する領域は、ARMS2 と HTRA1 の 2 遺伝子にまたがっており、この 2 つの遺伝子のうち、どちらの遺伝子 (あるいは両方の遺伝子) がどのようなメカニズムで wet-AMD の発症リスクを高めることに寄与しているのか、現時点では分かっていない。

2. 研究の目的

我々のグループは、これらの先行研究の結果をもとに、ARMS2-HTRA1 領域における変異が、ARMS2, HTRA1 の発現制御にもたらす影響を詳細に調べるため、約 200 人の wet-AMD 患者ゲノムの ARMS2-HTRA1 領域を詳細に調べた。その結果、HTRA1 のエクソン 1 の上流約 4kbp の位置に 443bp にわたって大規模に変異・欠失が生じている領域 (indel) が確認され、wet-AMD と診断された患者では、この indel の遺伝子型が有意に多い結果が得られた。さらに、この indel を含む HTRA1 の promoter 領域をクローニングし、Luciferase assay を用いて、HTRA1 の promoter 活性を調べた結果、indel を含む配列において、有意に promoter 活性が上昇していることが分かった。

さらに、indel をもつ wet-AMD 患者より iPS 細胞を作製し、正常な遺伝子型の健常者由来の iPS 細胞と indel をもつ wet-AMD 患者由来の iPS 細胞の内在の HTRA1 の発現量を qRT-PCR で調べた結果、indel をもつ遺伝子型の細胞において、HTRA1 の発現量が有意に高い結果が得られている。これらの結果より、indel 型の変異を有している場合、生体内において HTRA1 の発現が上昇している可能性が考えられ、この HTRA1 の発現上昇が wet-AMD の発症リスクとなっている可能性が示唆された。また、これらの結果を踏まえて、我々は生体内における HTRA1 の発現上昇が wet-AMD の一因になっていると考え、CAG promoter でマウス Htra1 を全身性に強制発現されるトランスジェニックマウス (Htra1-Tg) を作製し、このマウスの継時的に観察した。その結果、生後 1 年の Htra1-tg マウスにおいて、約 20% の個体で、ブルッフ膜の損傷と、脈絡膜側から網膜側に向かって、放射状の新生血管が観察された (Namayama, M., Iejima, D., et al. IOVS. 2014)

これらの先行研究結果より、我々は AMD 患者に多くみられる indel 変異が HTRA1 の発現上昇に寄与し、HTRA1 の発現上昇が網膜の血管新生を誘導するリスクとなると考えているが、生体内における HTRA1 の上昇が、どのような機序で最終的に血管新生を引き起こすのかは現在のところ分かっていない。このような背景から、本研究は HTRA1 と血管新生の関係に着目し、HTRA1 の発現上昇を起点とした網膜における血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) の採取

先行研究にて使用した HTRA1 ノックアウトマウス (Oka, C. et al. Development 2004)、ならびに HTRA1 トランスジェニックマウス (Namayama, M., Iejima, D., et al. IOVS. 2014) を交配・妊娠させ、これらのマウス由来の E13.5 の胎仔マウスを摘出した。摘出した胎仔を実体顕微鏡下でメスを用いて細かく刻み、細断したマウス組織を回収し、セルストレーナー等を用いて一定以下のサイズに分け、これを培養液中に播種することで、MEF を採取した。

2) HTRA1 シグナルの解析

ヒトおよびマウスの HTRA1 発現ベクターを導入した HEK293T および HUVEC、また、1) にて採取した MEF より、RIPA buffer を用いて細胞由来タンパク質 Lysate を回収した。また、これらの細胞より放出される分泌タンパクを調べるため、培養細胞を前日に 0~5% の無血清・

低血清条件の培養液に置換し、翌日、培養上清を回収し、Amicon Ultra を用いて上清を遠心濃縮し、培養上清由来タンパク質を回収した。これらの、細胞ならびに培養上清由来タンパク質に対して、HTRA1, VEGF, Smad, pSmad 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、各条件における関連分子の発現を調べた。

3) 細胞間インタラクションの解析

共培養に使用するカルチャーインサートを用意し、上段に HTRA1-Tg マウス由来の MEF を、下段に Wild type マウス由来の NEF を播種し、コンフルエントになるまで培養した。コンフルエントになったところで、上清を無血清培地に切り替えて一晚培養し、それぞれの細胞ならびに上清を回収し、1)の要領で Lysate ならびに上清由来タンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングにより解析を行った。

4)免疫染色

先行研究にて使用した、Wild type マウス、HTRA1 ノックアウトマウス、HTRA1-Tg マウスより眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、クライオスタットを用いて凍結切片を作製した。作製した凍結切片に対して、一時抗体として HTRA1、Smad、pSmad、VEGF、VEGFR 抗体を作用させ、二次抗体として Alexa488, Alexa647 標識の抗体を作用させ、DAPI で核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、マウス網膜における各分子の発現傾向を観察した。

4 . 研究成果

1)TGF-beta シグナルの解析

HEK293T にヒト HTRA1 を強制発現させ、Lysate と培養上清を回収して関連分子の発現傾向を調べた結果、TGF-beta シグナルの下流に位置する Smad2/3 の発現量については HTRA1 の発現量の違いによる差は見られなかった。また、pSmad2/3 抗体を用いて Smad2/3 のリン酸化を調べた結果、HTRA1 の発現亢進に伴い、リン酸化は減少する結果となり、HTRA1 が細胞内の Smad2/3 のリン酸化を抑制することが示唆された。また、VEGF については、当初、HTRA1 により発現が更新させることを予想していたが、予想に反し、HTRA1 の発現が亢進しても、細胞内の VEGF 量は一定であり、VEGF の発現については、直接 HTRA1 の影響を受けないことが示唆される結果となった。一方、培養上清中の分泌タンパク質を調べた結果、HTRA1 の発現量の上昇に伴い、細胞外の HTRA1 量が減少し、細胞外の VEGF 量も減少する結果となった。以上の結果より、HTRA1 は、血管新生に必須とされる VEGF の発現に対しては、直接的には寄与していないことが示唆された。

2)免疫染色による TGF-beta シグナルの解析

Wild type マウスと HTRA1-Tg マウスの発現を調べた結果、視細胞層や神経節細胞層では HTRA1 の発現量に有意な差はみられず、Smad2/3 や pSmad2/3 にも有意な差はみられなかった。また、これらの層では、VEGF の発現はみられなかった。一方、脈絡膜では、HTRA1-Tg マウスにおいて、HTRA1 の有意な発現増加が見られた一方、pSmad 陽性の細胞数が減少していた。この結果より、HTRA1-Tg マウスでは脈絡膜血管において HTRA1 が強く発現しており、これが血管新生に寄与している可能性が示唆された。

3)細胞間インタラクションによる VEGF の発現亢進

HTRA1 強制発現させたマウス胎児由来線維芽細胞と、同系統の Wild type マウス胎児由来線維芽細胞を共培養し、HTRA1 を強制発現させた細胞が近隣の細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、HTRA1 強制発現マウス由来の細胞と共培養をした Wild type 由来の細胞で有意に VEGF の発現量が亢進している結果が得られた。また、培養上清中の VEGF 量についても調べた結果、上清中の VEGF も有意に上昇していた。この結果より、HTRA1 は細胞間相互作用により、近隣の細胞の VEGF の発現を亢進させる可能性が示唆された。

これらの結果より、細胞内で発現の亢進した HTRA1 は直接的に VEGF の発現を亢進させるのではなく、HTRA1 の発現に亢進に伴い、なんらかの細胞間インタラクションが発生し、その結果として、近隣の細胞の VEGF の発現が亢進し、結果として血管新生が亢進することが考えられる。今後、どのような分子が細胞間インタラクションに関与しているかなども含め、HTRA1 による VEGF 発現亢進のメカニズムの詳細が明らかになることで、新規の予防や治療技術に結びつくことが期待される。

5 . 主な発表論文等

発表文献なし

[雑誌論文](計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：研究員

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩田 岳

ローマ字氏名：Takeshi Iwata

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。